

Travail du Laboratoire de Physiologie de l'Institut Océanographique

FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1922

THÈSE

N^o 263

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

Julio LOPEZ-LOMBA

Licencié ès sciences

LES POISSONS

RÉACTIFS BIOLOGIQUES TRÈS SENSIBLES
DES ALCALOÏDES

Président : M. ROGER. Professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1922

263

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1922

THÈSE

N°

263

POUR

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

Julio LOPEZ-LOMBA

Licencié es sciences

LES POISSONS

RÉACTIFS BIOLOGIQUES TRÈS SENSIBLES
DES ALCALOÏDES

Président : M. ROGER, Professeur



PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1922

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

LE DOYEN : M. ROGER
ASSESEUR : G. POUCHET
PROFESSEURS

	MM
Anatomie	NICOLAS
Anatomie médico-chirurgicale	CUNEO
Physiologie	CH. RICHET
Physique médicale	ANDRÉ BROCA
Chimie organique et Chimie générale	DESGREZ
Bactériologie	BEZANCON
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	BRUMPT
Pathologie et Thérapeutique générales	MARCEL LABBÉ
Pathologie médicale	RENON
Pathologie chirurgicale	LECENE
Anatomie pathologique	LETELLE
Histologie	PRÉNANT
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET
Thérapeutique	CARNOT
Hygiène	BERNARD
Médecine légale	BALTHAZARD
Histoire de la médecine et de la chirurgie	MENETRIER
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER
Clinique médicale	ACHARD
	WIDAL
	GILBERT
	CHAUFFARD
Hygiène et clinique de la 1 ^{re} enfance	MARFAN
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	CLAUDE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JEANSELME
Clinique des maladies du système nerveux	PIERRE MARIE
Clinique des maladies contagieuses	TEISSIER
Clinique chirurgicale	DELBET
	GOSSET
	LEJARS
	HARTMANN
Clinique ophtalmologique	DR LAPPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires	LEGUEU
Clinique d'accouchements	BAR
	COUVELAIRE
	BRINDEAU
Clinique gynécologique	J.-L. FAURE
Clinique chirurgicale infantile	AUGUSTE BROCA
Clinique thérapeutique	VAQUEZ
Clinique d'Oto-rhino-laryngologie	SEBILEAU
Clinique thérapeutique chirurgicale	PIERRE DUVAL

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.			
ABRAMI	DUVOIR	LARDENNOIS	RATHERY
ALGLAVE	FISSINGER	LELORIER	RETTERRER
BASSET	GARNIER	LEMIERRE	RIBIERRE
BAUDOUIN	GOUGEROT	LEQUEUX	RICHAUD
BLANCHETIERE	GREGOIRE	LEREBoullet	ROUSSY
BRANCA	GUENIOT	LERI	ROUVIERE
CAMUS	GUILLEIN	LEVY-SOLAL	SCHWARTZ(A.)
CHAMPY	GUILLEMINOT	MATHIEU	TANON
CHEVASSU	HEITZ-BOYER	METZGER	TERRIEN
CHIRAY	JOYEUX	MOCQUOT	TIFFENEAU
CLERC	LABBE HENRI	MULON	VILLARET
DEBRE	LAIGNEL-LAVASTINE	OKINCZYC	
DESMAREST	LANGLOIS	PHILIBERT	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'en tend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

A MON PÈRE

A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR C. H. ROGER

Doyen de la Faculté de Médecine de Paris
Professeur de Pathologie expérimentale
Membre de l'Académie de Médecine

En témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

A MON CHER MAITRE

MONSIEUR LE DOCTEUR P. PORTIER

Professeur de Physiologie à la Faculté des Sciences
de Paris et à l'Institut Océanographique

*Qui m'a inspiré ces recherches
et dont la critique éclairée m'a
été précieuse au cours de ce
travail.*

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

MM. le Professeur HARTMANN

le Docteur TRÉMOLLIÈRES

le Docteur FREDET

le Docteur MILIAN

le Professeur TEISSIER

le Professeur SEBILEAU

le Docteur APPERT

le Professeur MARFAN.

LES POISSONS

RÉACTIFS BIOLOGIQUES TRÈS SENSIBLES DES ALCALOÏDES

AVANT-PROPOS

Les médecins légistes s'accordent à reconnaître que les moyens dont ils disposent actuellement sont insuffisants pour reconnaître avec certitude la présence de faibles quantités de certains alcaloïdes.

Le mémoire que nous présentons comme thèse de Doctorat en médecine n'est pas à proprement parler un travail de médecine légale. Notre idée directrice est avant tout d'ordre physiologique, mais les recherches toxicologiques et les résultats précis auxquels elle aboutit pourront, nous l'espérons, être avantageusement utilisés par la médecine légale.

Ce travail n'a pu être mené à bien que grâce aux ressources qui nous ont été libéralement fournies par les beaux laboratoires de l'Institut Océanographique.

Nous prions son illustre fondateur S. A. S. le Prince de Monaco d'agréer l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

Nous remercions notre ami Marcel Duval, licencié ès sciences pour les renseignements qu'il nous a fournis en ce qui concerne la mesure de la concentration des ions hydrogène.

CHAPITRE PREMIER

Considérations générales sur les recherches entreprises. — Idée directrice du travail

Il est souvent nécessaire dans les recherches de médecine légale, de reconnaître avec certitude de très petites quantités de poisons.

Par des méthodes que nous n'avons pas à examiner, on s'efforce d'extraire des organes et de concentrer les substances toxiques qui avaient été introduites dans l'économie.

On dispose alors en général de très faibles quantités de matière qu'il s'agit de reconnaître avec certitude. Deux méthodes s'offrent à ce moment à l'expérimentateur : 1° la méthode chimique qui, par des réactions appropriées, permet d'identifier la substance avec une espèce chimique déterminée ; 2° la méthode biologique qui consiste à introduire le produit à étudier dans le milieu intérieur d'un être vivant et à observer les modifications physiologiques apparaissant dans le fonctionnement des divers appareils. Ces deux méthodes ne s'excluent pas ; elles se complètent et se prêtent un mutuel appui.

Il semble cependant bien que pour certaines substances élaborées par les êtres vivants, la méthode biologique offre des avantages incontestables. Elle paraît, jusqu'ici, être seule applicable dans certains cas : reconnaissance des toxines, diagnostic de la

provenance spécifique de petites quantités de sang par la méthode des précipitines, etc.

Il est très remarquable que ces réactions biologiques ont acquis, aux mains des expérimentateurs un extraordinaire degré de sensibilité.

Nous nous sommes demandé si, pour déceler la présence de certains poisons d'origine végétale : les alcaloïdes et les glucosides, les méthodes biologiques utilisées actuellement, ne pourraient pas être améliorées.

Et en effet, c'est la grenouille qui est l'animal réactif le plus souvent utilisé. On introduit ordinairement dans un sac lymphatique la substance à étudier, et on observe les effets physiologiques qui apparaissent du côté des appareils circulatoire, musculaire et nerveux.

Etant donné ce qu'on sait du mécanisme d'action des poisons, on peut se demander si la technique de ces recherches ne pourrait pas être perfectionnée.

Claude Bernard a bien montré en effet que, pour la plupart des poisons le maximum d'action était obtenu lorsque ceux-ci étaient introduits d'emblée dans le système artériel de manière à atteindre *directement les éléments anatomiques* par les capillaires artériels, sans avoir traversé le foie ou d'autres organes qui peuvent les immobiliser, les neutraliser ou les éliminer en partie.

Le système artériel constitue ainsi, suivant l'expression du célèbre physiologiste *le champ d'action des poisons*.

L'hydrogène sulfuré mêlé à l'air en faible proportion et absorbé par le poumon, atteint directement les éléments anatomiques par le système artériel ; absorbé par cette voie, il constitue un poison redoutable.

Au contraire, injecté en solution sous la peau ou dans le rectum, ou même introduit dans l'estomac, il passe dans le sang veineux et est éliminé au niveau du poumon avec les gaz expirés, ce que montre un papier imprégné d'acétate de plomb. Dans ces conditions on n'observe aucun phénomène toxique (1).

A une époque récente, le professeur Roger, dans une série de travaux originaux et de mémoires d'ensemble a attiré de nouveau l'attention sur l'importance de la voie d'introduction des poisons.

D'une façon générale, il a montré que la plupart des tissus (muscles, tissu cellulaire sous-cutané, etc.) pouvaient immobiliser et transformer les substances toxiques.

Mais Roger a surtout bien mis en évidence le rôle prépondérant joué par le foie et le poumon dans cette lutte contre les poisons (2).

Il a montré expérimentalement que les alcaloïdes injectés par la veine porte se montrent deux ou trois fois moins toxiques que lorsqu'ils sont injectés par une veine périphérique.

Le foie intervient surtout par sa fonction glycogénique : beaucoup de poisons sont liés au sucre, forment des glycosides qui, par oxydation de l'extrémité de la chaîne sucrée, sont transformés en composés glycuroniques dépourvus de toxicité ; ces composés sont ensuite éliminés par l'urine.

Le foie, filtre interposé sur la voie d'absorption intestinale, est donc le grand protecteur de l'organisme contre les poisons.

1. Cl. Bernard, *Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses* (p. 57).

2. H. Roger, Thèse de Paris, 1887; *Action des organes sur la strychnine* (*Presse médicale*, 15 août 1898); *Action du poumon sur quelques substances toxiques* (*Presse médicale*, 7 juin 1899).

Après lui, c'est le poumon qui a le rôle le plus important. Dès 1898, Roger montre que le poumon arrête certains poisons et leur fait perdre par oxydation une partie de leur toxicité. Les injections de la substance toxique sont faites comparativement soit dans le bout central de la carotide primitive, ce qui leur permet de refluer jusque dans l'aorte, soit dans une veine périphérique. Dans ce dernier cas la toxicité se trouve considérablement affaiblie ; il semble donc que le poumon, traversé ici par la substance toxique, l'ait retenue et transformée.

Des expériences directes ont montré à Roger qu'il en était bien ainsi. Un poumon isolé de l'organisme et irrigué artificiellement, affaiblit la toxicité des solutions d'alcaloïdes qui le traversent. Pour que l'action se produise, le poumon doit respirer de l'oxygène ; les gaz inertes (azote, hydrogène), suppriment cette fonction du poumon.

Ces travaux de Roger (1) ont été confirmés par Boeri et Giuranna, par Cafiero et Kausky.

Cet ensemble de faits comporte pour nous un enseignement précieux. Lorsque nous voudrions mettre en évidence l'action d'un poison sur l'organisme avec le maximum de sensibilité, nous devons faire en sorte que la substance toxique parvienne *d'emblée dans le système des capillaires artériels « champ d'action des poisons »*.

Or, il semble bien que les poissons nous offrent des dispositions anatomiques très favorables aux conditions expérimentales que nous venons de préciser.

Il paraît probable que la branchie, qui permet

1. H. Roger. *Les fonctions du poumon*. (Presse médicale 1921, 5 oct., p. 795). *Nouveau traité de médecine de Roger, Vidal et Teissier*. Fasc. VI, p. 1. Paris Masson, 1922.

les échanges gazeux entre l'eau et le milieu intérieur du poisson, se laissera aussi traverser par les substances toxiques dissoutes dans l'eau. Les alcaloïdes, ayant ainsi pénétré dans le sang, gagneront immédiatement les capillaires artériels sans même avoir traversé le cœur, et surtout sans s'être mélangés comme chez les batraciens avec une certaine quantité de sang veineux.

Il est bien évident que, seule, l'expérience permettra de vérifier le bien fondé de la conception que nous venons d'exposer. Des poissons de petite taille seront immergés dans un faible volume de la solution de la substance toxique.

Tout l'effort expérimental portera sur la détermination des facteurs physiques, chimiques et biologiques qui exaltent, au maximum, l'absorption du poison par la branchie.

La *tension superficielle* est peut-être le plus important de ces facteurs. On sait qu'un liquide à tension superficielle faible tend toujours à se substituer à un liquide à tension superficielle forte. C'est ainsi que la bile, par ses sels biliaires paraît jouer un rôle plus important qu'il n'est admis classiquement, dans le phénomène de l'absorption intestinale. L'abaissement de la tension superficielle paraît être le *primum movens* qui force la barrière intestinale ; d'autres mécanismes se combinent avec celui-ci (contractions des fibres musculaires lisses, renouvellement des liquides par la circulation, phénomènes d'osmose, etc.).

On pourrait objecter que les invertébrés qui constituent l'immense majorité des êtres vivants ne possèdent pas de sels biliaires. Mais les recherches du professeur Portier et de M. et Mme Chauchard (1)

1. Du rôle de la tension superficielle dans le mécanisme des

ont montré que les liquides digestifs de tous les invertébrés étudiés par ces expérimentateurs (mollusques, crustacés, échinodermes) possèdent une tension superficielle très basse, plus basse même que celle de la bile des vertébrés.

Ce facteur important du mécanisme de l'absorption semble donc intervenir dans toute la série animale.

D'ailleurs Billard et Dieulafoy (1) ont déjà montré expérimentalement que la tension superficielle était un facteur important de toxicité pour certains poisons.

C'est ainsi que les solutions de curare se montrent plus toxiques lorsqu'on les additionne de proportions convenables de savon ou d'alcool, et qu'il semble y avoir une relation bien nette entre la toxicité des alcools et leur tension superficielle.

Nous devons donc, pour favoriser l'absorption des substances toxiques par la branchie, nous efforcer d'abaisser au maximum leur tension superficielle. Il va sans dire que nous devons en même temps éviter que l'agent d'abaissement de la tension ne soit lui-même toxique.

On verra qu'une étude méthodique de cette question nous a amené à additionner nos solutions d'alkaloïdes, de quantités déterminées de sels biliaires,

phénomènes d'absorption (Compt. rend. Soc. Biol., t. 75, 1913, p. 114).

Sur la tension superficielle des liquides digestifs d'invertébrés (Comp. rend. Soc. Biol., t. 75, 1913, p. 116).

1. Billard et Dieulafoy, *Influence de la tension superficielle des solutions de curare sur leur toxicité* (Comp. rend. Soc. Biol., 1904, p. 146).

Id., *la Toxicité des alcools fonction de leur tension superficielle* (Comp. rend. Soc. Biol., 1904, p. 452).

Un second facteur très important aussi est *l'état de la mucine* de la branchie.

On sait en effet que la mucine secrétée par des cellules spéciales imprègne les muqueuses ou même la peau de certains animaux aquatiques et peut s'opposer efficacement à l'absorption. Cl. Bernard (1) cite à ce sujet des expériences très nettes.

Une grenouille est conservée dans un bocal de telle manière qu'une partie de son corps plonge dans l'eau. On laisse tomber sur sa peau quelques gouttes d'une dissolution de curare; au bout de deux heures, elle ne présente aucun symptôme d'empoisonnement. On lave alors cette grenouille et on la met dans l'air sec pendant une heure. On laisse tomber sur sa peau quelques gouttes de la même solution de curare: la grenouille ressent les effets de l'empoisonnement et meurt au bout d'une demi-heure environ.

Si la grenouille est depuis plus longtemps dans l'air sec, l'empoisonnement peut se produire en un temps beaucoup plus court, dix minutes environ.

Paul Bert a observé des faits analogues chez les poissons. P. Regnard (2) relate que ce physiologiste étudiant l'action de l'eau de mer sur les anguilles remarqua que certaines de celles-ci mouraient pendant que d'autres résistaient. Il s'aperçut que toutes celles qu'il mettait dans l'eau de mer survivaient, pendant que toutes celles que prenait le garçon de laboratoire mouraient. « La cause en était dans un détail opératoire. Paul Bert saisissait les anguilles avec une épuisette et les déposait dans le bac d'eau salée. Le garçon essayait de les prendre à la main, puis pour mieux les tenir, il les mettait dans un tor-

1. *Leçons sur les substances toxiques*, p. 292.

2. *La vie dans les eaux*, p. 438, Paris, Masson, 1891.

chon, luttait avec elles, essuyait ainsi tout le mucus qui recouvre leur corps, et les désarmait vis-à-vis de l'action osmotique du sel ».

Comme nous ne pouvons pas essayer toutes les lamelles branchiales de nos poissons, nous nous efforcerons de solubiliser la mucine ou tout au moins de diminuer sa viscosité.

Or nous savons que la mucine précipitée par les solutions acides, et particulièrement par l'acide acétique, est au contraire soluble dans les solutions alcalines. Par des recherches méthodiques nous nous efforcerons donc de placer dans des solutions d'une alcalinité déterminée, telle qu'elle ne soit pas nocive à l'animal par elle-même, et qu'elle ne précipite pas la substance toxique en solution, tout en favorisant la pénétration du poison à travers l'épithélium branchial (1).

Enfin, nous n'oublierons pas que, toutes choses égales d'ailleurs, la température intervient d'une manière très efficace dans l'exaltation ou le ralentissement des phénomènes biologiques des poïkilothermes. Nous nous efforcerons donc de maintenir nos poissons d'expérience à une température qui assure le maximum d'efficacité au poison qui a pénétré dans le milieu intérieur.

D'autres conditions accessoires seront méthodiquement examinées.

Lorsque ce travail préliminaire sera terminé, nous serons en mesure d'aborder efficacement l'étude de quelques alcaloïdes et de déceler chacun d'eux avec le maximum de sensibilité.

1. Il s'agit ici de la *réaction actuelle*, donnée par la concentration des ions H, la seule qui donne des renseignements intéressants sur la question que nous étudions.

Nous pouvons dire que les résultats de cette enquête expérimentale — pour laquelle 450 animaux ont été employés — ont dépassé nos espérances.

Lorsque toutes les conditions d'absorption optima par la branchie ont été réalisées, lorsqu'en même temps les facteurs biologiques ont été convenablement choisis, les poissons de petite taille constituent un réactif biologique d'une extrême sensibilité pour certains toxiques et en particulier pour les alcaloïdes.

C'est ainsi que la suite de ce travail montrera qu'on parvient à déceler 1/2000 de milligramme de strychnine, 1/8000 de milligramme d'aconitine, 1/400 de milligramme de digitaline.

CHAPITRE II

Remarques concernant certaines conditions expérimentales. Influence de l'espèce. Influence de la taille.

Des expériences préliminaires nous ont montré que la sensibilité des poissons d'espèces différentes, vis-à-vis des substances toxiques, varie dans des limites assez larges.

Par exemple plaçons différents poissons dans des solutions de sulfate de strychnine à 1 p. 100.000, maintenues à la même température. Chaque animal se trouvera dans une quantité de solution proportionnelle à son poids. Dans ces conditions une anguille meurt en 44 minutes, une épineche en 52 minutes, un vairon en 86 minutes, un poisson rouge en trois heures et demie. Dans des solutions du même alcaloïde mais à 1 p. 200.000, un vairon meurt en 1 h. 54 minutes tandis qu'un poisson rouge ne meurt qu'en 19 heures. A 1 p. 500.000 : anguille 11 heures, épineche 20 heures, vairon 24 heures.

On aurait donc avantage à employer dans chaque cas les individus de l'espèce qui constituent le réactif le meilleur.

Malheureusement dans les conditions ordinaires on est limité par la faible quantité de résidu alcaloïdique obtenu. Après extraction par la méthode de

Stas-Ogier on n'obtient en effet — sous forme de minces enduits sur des verres de montre — que quelques milligrammes seulement de la matière qu'il s'agit de déterminer. Après prélèvement d'une partie pour les réactions chimiques — toujours indispensables — il reste souvent bien peu de substance, et il s'agit de la ménager, pour réaliser si possible plusieurs réactions biologiques.

Il y a donc grand intérêt à employer des poissons très petits et à les placer dans une quantité minimum de solution.

Les poissons rouges, les vairons et les épinoches sont les trois animaux qui réunissent les conditions les meilleures pour ces recherches (1). D'abord parce qu'on les trouve sans difficulté dans le commerce et qu'on peut en avoir constamment une réserve car ils vivent parfaitement en aquarium ; ensuite parce que leur poids varie relativement peu d'un individu à l'autre. En effet le poids des vairons oscille entre 0 gr. 60 et 2 gr. 30, celui des épinoches entre 1 et 2 grammes. On trouve facilement des poissons rouges qui pèsent 1 gr. 20 à 2 gr. 50.

Mais l'épinoche est peut-être le plus intéressant des trois, car on s'en procure sans difficulté des échantillons d'une ressemblance absolue et dont le poids ne diffère que de quelques centigrammes.

Ces poissons placés dans des petits ballons contenant 25 centimètres cubes d'eau ordinaire vivent trois à cinq jours à 20 degrés. Ils résistent parfois plus de deux jours et demi dans 20 centimètres cubes.

Nous voudrions enfin pour terminer ces remarques, insister sur l'importance que l'on devra attacher,

1. Nous avons employé l'Epinoche à queue lisse (*Gasterosteus Leiurus*), le Vairon commun (*Proximus Laevis*) et le Poisson rouge (*Cyprinopsis auratus*).

dans ces expériences, à certains facteurs concernant les individus employés. Non seulement il faut choisir des poissons de même espèce, mais il est indispensable aussi d'opérer avec des animaux de même taille et de même sexe si possible. Cette dernière condition est facile à obtenir pour certains poissons comme les épinoches dont les mâles se différencient par leur poids et leur couleur.

Mais c'est surtout la taille qui importe. Nous avons constaté en effet, que des expériences comparatives gagnent beaucoup en précision lorsqu'on a soin d'opérer avec des poissons de même poids à 5 centigrammes près au moins.

Contrairement à ce qu'on pouvait attendre à première vue, la sensibilité des poissons vis-à-vis des alcaloïdes augmente avec leur taille. Les plus petits poissons résistent mieux que les gros. Ceci est vrai du moins pour la strychnine, l'aconitine, la picrotoxine, la morphine, la digitaline.

Pour donner une idée des différences remarquées nous citerons les expériences suivantes faites avec des vairons.

Dans des solutions de sulfate de strychnine à 1 p. 100.000 dans l'eau ordinaire sont placés quatre vairons pesant 0 gr. 82, 0 gr. 93, 2 gr. 03 et 2 gr. 08. Ils meurent respectivement en 62, 57, 50 et 47 minutes. Dans des solutions de strychnine au même taux mais faites dans l'eau distillée des poissons de 0 gr. 82, 2 gr. 08, 2 gr. 26 meurent en 90, 69 et 30 minutes.

De même dans du chlorhydrate d'aconitine à 1 p. 50.000 trois vairons de 0 gr. 86, 1 gr. et 1 gr. 80 meurent en 42, 38 et 33 minutes.

Dans la picrotoxine à 1 p. 100.000 deux poissons

de 0 gr. 43 et 1 gr. 47 meurent en 3 heures 8 minutes et 2 heures 14 minutes.

Enfin dans la digitaline à 1 p. 100.000 deux échantillons de 1 gr. 67 et 0 gr. 90 meurent en 2 heures et 4 heures 55 minutes.

Par contre le chlorhydrate de cocaïne et la stovaïne ont donné des résultats inverses.

Quelle que soit l'explication de ces phénomènes, nous croyons avoir fait comprendre l'intérêt qu'il y a, à opérer avec des animaux de même poids. De l'étude de ce facteur nous avons conclu que, dans la pratique, on ne devra pas faire des expériences comparatives, nous le répétons, avec des écarts de poids de plus de 5 centigrammes.

Or, quand on possède une cinquantaine d'échantillons, et surtout s'il s'agit d'épinoches, cette condition est facile à réaliser. Par simple appréciation visuelle on choisit souvent d'emblée deux poissons de même poids.

CHAPITRE III

Conditions de sensibilisation maxima aux poisons. — Etude méthodique de chaque facteur.

1° Réaction du milieu

Il est nécessaire de la connaître avec précision. Le papier de tournesol est un réactif banal qui ne peut donner que des indications imparfaites.

Par contre une exactitude suffisante sera obtenue par une simple mesure de la concentration des ions-H par la méthode colorimétrique.

Nous n'avons pas à exposer ici les principes sur lesquels est basée cette méthode.

Nous dirons seulement que, l'eau pure qui contient autant d'ions-H que d'ions-OH est toujours faiblement dissociée en ions-H à charge positive et en ions-OH à charge négative. Le degré de dissociation varie relativement peu avec la température ; il est toujours le même à une température donnée.

Or, on dit que la réaction d'une solution est neutre lorsque le nombre des ions-H et des ions-OH libres est le même ; elle est acide lorsqu'elle contient plus d'ions-H que d'ions-OH et elle est alcaline lorsque le nombre des ions-OH l'emporte sur le nombre des ions-H.

Pour exprimer la réaction d'une solution on emploie la notation introduite dans la science par

Sørensen en 1909 (1). Avec cette notation on dit qu'une solution est neutre lorsque le logarithme de la concentration des ions-H est égal à 7,1 et on écrit $p. H = 7,1$.

Une solution est alcaline lorsque son $p. H$ est supérieur à 7,1 et elle est acide lorsqu'il est inférieur à 7,1.

La méthode colorimétrique est basée sur la propriété qu'ont les indicateurs colorés de virer lorsque la concentration des ions-H change, et sur le fait que chaque colorant vire entre des limites d'acidité ou d'alcalinité différentes.

Comme pour nos recherches on n'aura à faire des mesures qu'en milieu alcalin, et qu'on n'aura guère à aller au-dessus de $p. H = 9$ les deux colorants utiles seront le rouge de crésol qui donne une échelle de teintes entre des $p. H$ égaux à 7,2 et 8,3 et le bleu de thymol qui la donne entre $p. H = 8,2$ et 9,8.

Pour faire les solutions types, c'est-à-dire ayant un $p. H$ connu il suffira d'employer une solution de borax à 12 gr. 108 pour un litre d'eau distillée et une solution d'acide borique : 12 gr. 404 et NaCl : 2 gr. 925 par litre. Ces solutions seront mélangées dans des proportions définies (2).

Pour ramener les solutions à une alcalinité ou à une acidité données nous avons employé des solutions de carbonate de soude ou d'acide acétique à 10 pour 100 environ dont un certain nombre de gouttes fut ajouté aux milieux à étudier. Ceux-ci se

1. Sørensen, compte-rendu de Labor. de Carlsberg, 1909.

2. Pour tous les renseignements nécessaires consulter : Palitzsch S. *Bull. de l'Inst. Océanog.*, 5 avril 1922 ; Clark W. M. *The determination of hydrogen ions*. Baltimore, Michaelis L. *Die Wasserstoffionen Konzentration*. Berlin. Prideaux. E. B. R. *The theory and use of indicators*, London.

trouvaient ainsi ramenés à la pression des ions hydrogènes voulue.

Pour montrer l'importance que nous attachons à cette condition expérimentale nous allons rapporter les expériences suivantes :

Des épinoches (de poids toujours comparables, et à la même température) sont placées soit dans l'eau ordinaire, soit dans l'eau distillée du commerce.

1° Acidification :

a) Deux ballons contiennent chacun 25 centimètres cubes, l'un d'eau distillée, l'autre d'eau ordinaire. Dans chacun d'eux ajoutons une quantité donnée d'acide acétique à 10 o/o, une goutte par exemple. On constate que le poisson qui est dans l'eau ordinaire meurt en vingt et une heures tandis que celui qui est dans l'eau distillée meurt en 56 minutes.

b) Répétons la même expérience, mais au lieu d'une goutte, ajoutons deux gouttes d'acide acétique. Ce sera encore celui qui est dans l'eau distillée qui mourra le plus vite : en 42 minutes, tandis que celui qui est dans l'eau ordinaire sera vivant au bout de trois heures et demie.

Alcalinisation :

a) Remplaçons l'acide acétique par du carbonate de soude à 10 o/o. Avec deux gouttes de cette solution dans 25 centimètres cubes de liquide, le poisson qui est dans l'eau ordinaire résiste 21 heures, celui qui est dans l'eau distillée meurt en 23 minutes.

b) Re commençons ces expériences en doublant la dose de carbonate de soude. Résultats analogues : mort en 46 minutes dans l'eau distillée et survie de plus de trois heures et demie dans l'eau ordinaire.

En présence de ces faits on serait tenté de conclure que pour un même degré d'acidification ou d'alcalinisation les poissons résistent moins bien

dans l'eau distillée que dans l'eau ordinaire. Or il n'en est rien et ces résultats, paradoxaux au premier abord, s'expliquent très facilement par l'étude de l'état d'ionisation des solutions employées.

Ainsi il ne faudra en aucun cas négliger la connaissance de ce facteur. Deux expériences ne seront comparables que si l'on opère dans des solutions ayant la même réaction effective. Et celle-ci n'est pas en général fonction directe de la quantité d'acide ou d'alcali ajoutée. Nous venons de voir que deux poissons semblables, se comportent différemment quand ils vivent dans des quantités égales d'eau ordinaire ou d'eau distillée, additionnées d'une même dose de carbonate de soude par exemple. Le fait que celui qui est dans l'eau distillée meurt plus vite, s'explique quand on sait que les alcalinités réelles des deux solutions sont très différentes. Ainsi une goutte de carbonate de soude à 10 o/o dans 25 centimètres cubes de liquide fait passer l'eau distillée de $p. H = 5,8$ à $p. H = 10,3$, tandis que l'eau ordinaire passe de $p. H = 7,7$ à $p. H = 9,4$ (1).

Ces considérations terminées nous allons exposer les principales étapes expérimentales qui nous ont conduit d'une part à préférer l'eau ordinaire à l'eau distillée, d'autre part à donner à l'eau ordinaire une certaine alcalinité.

a) *Inconvénients de l'eau distillée.* — L'eau ordinaire contient dans des proportions qui peuvent changer beaucoup suivant les lieux, les saisons, etc., des sels, des matières organiques, des gaz. Il y aurait donc eu intérêt à pouvoir employer de l'eau distillée qui peut être obtenue chimiquement pure. Les varia-

1. Ceci est dû à ce qu'il se forme dans l'eau ordinaire des sels qui jouent le rôle de « sels tampons », en particulier du bicarbonate de soude.

tions d'un des éléments dans les expériences auraient pu être ainsi éliminées. Or nous allons voir que l'eau distillée n'est pas utilisable avec avantage.

L'eau distillée du commerce obtenue dans des alambics de cuivre, contient par ce fait des traces de ce métal sous forme de sels qui, comme l'a montré Mlle Suzanne Lédébt (1), sont toxiques pour les vairons; les tanches et les goujons. Des vairons placés dans 150 centimètres cubes de cette eau distillée meurent en six heures à la température du laboratoire. Les épinoches résistent mieux : dans 25 centimètres cubes et à 20 degrés elles vivent plus de 24 heures. Or ces deux derniers poissons vivent trois à cinq jours dans 25 centimètres cubes d'eau ordinaire à 20 degrés (2).

D'après nous, si on peut admettre que des traces de sels de cuivre contribuent à la mort plus rapide des poissons dans l'eau distillée, la réaction de la solution doit avoir son influence. L'eau distillée du commerce a en effet un p. H = 5,8 tandis que l'eau potable à Paris, a toujours un p. H supérieur à 7,5.

Quoi qu'il en soit, d'autres raisons nous feront plaider en faveur de l'emploi de l'eau ordinaire. En effet dans celle-ci la toxicité des alcaloïdes est plus grande. Ce fait nous est apparu d'une façon constante quand on envisage les différents poissons et les différents alcaloïdes. Nous donnerons quelques exemples.

Deux poissons rouges de même poids (1 gr. 33) sont placés chacun dans 100 centimètres cubes d'une solution de sulfate de strychnine à 1 p. 200.000.

1: Thèse de la Faculté de Sciences, Paris, 1914.

2. Les poissons rouges font exception à cette règle. Dans des petites quantités de liquide ils résistent plus longtemps dans l'eau distillée que dans l'eau ordinaire.

Température 19 degrés. L'un d'eux est dans l'eau ordinaire. Il réagit au moindre choc à la dix-neuvième minute et meurt en 19 heures. L'autre, dans l'eau distillée ne réagit pas encore au bout de deux heures et ne meurt que le septième jour, ayant eu les crises caractéristiques de l'intoxication par la strychnine pendant les six derniers jours.

Si l'on place trois poissons semblables (pesant 1 gr. 05 à 1 gr. 25) dans les mêmes conditions que précédemment, mais dans des solutions de sulfate de strychnine à 1 p. 100.000, on constate qu'ils meurent : dans l'eau ordinaire en 3 h. 37 min., dans l'eau redistillée en 3 h. 52 min. dans l'eau distillée en trois jours et demi.

Ces résultats se reproduisent lorsqu'on étudie les vairons, les épinoches, les anguilles. Voici quelques exemples toujours avec le sulfate de strychnine.

VAIRONS

Poids	Taux des solutions	Quant.	Temp.	Survie dans l'eau ordinaire	Survie dans l'eau distillée
				Minutes	Minutes
0 gr. 82	1 p. 100.000	25 cc.	18°	62	80
2 gr. 08	—	50 cc.	19°5	47	70
—	—	—	—	47	120
0 gr. 93	—	100 cc.	19°	57	+ de 167
—	1 p. 200.000	—	—	114	— 177
—	1 p. 400.000	—	—	164	— 185

EPINOCHEs

0 gr. 60	1 p. 100.000	25 cc.	21°	57	+ de 238
1 gr. 43	—	—	22°	22	36

De même de deux aiguilles de 22 grammes environ, placées chacune dans 500 centimètres cubes d'une solution de sulfate de strychnine à 1 p. 100.000 (t. = 20°), celle qui était dans l'eau ordinaire est

morte en quarante quatre minutes, tandis que l'autre dans l'eau distillée était encore vivante à la vingt-septième heure.

Nous nous contenterons de signaler que des différences analogues et toujours dans le même sens, se sont produites avec quelques autres alcaloïdes examinés.

Pour expliquer ces faits nous avons réalisé des expériences qui nous ont montré que le principal facteur agissant ici, c'est encore la réaction du liquide. En effet quand on ramène l'eau distillée à une concentration des ions hydrogène égale à celle de l'eau ordinaire (par addition de $\text{CO}^3 \text{Na}^+$), les différences de survie des poissons sont beaucoup moindres. Mais elles ne sont pas nulles, car, si, au début de l'expérience, le p. H est le même dans l'eau ordinaire et dans l'eau distillée, dans celle-ci il ne se maintient pas et descend régulièrement vers la neutralité.

Par exemple, si l'on place deux poissons chacun dans 25 centimètres cubes de solutions de carbonate de soude, l'un dans l'eau distillée l'autre dans l'eau ordinaire, ayant toutes les deux p. H = 9,6, on constate que l'alcalinité se maintient relativement constante dans l'eau ordinaire tandis que dans l'eau distillée elle est déjà descendue de p. H = 9,6 à p. H = 7,4 à la quatrième heure. Il n'y a pas lieu de donner ici l'explication de ce phénomène qui justifie encore notre choix de l'eau ordinaire (1).

b) Il y a intérêt à opérer en milieu alcalin.

Nous avons donc été amenés à démontrer expérimentalement que, — comme on pourrait le prévoir

1. Nous dirons seulement qu'en présence de l'acide carbonique dégagé par le poisson il se forme en particulier du bicarbonate de chaux qui agit comme sel tampon.

— la toxicité des solutions est moindre en milieu acide qu'en milieu alcalin où la mucine tend à se dissoudre.

Une épinoche placée dans 25 centimètres cubes d'une solution de sulfate de strychnine à 1 p. 100.000 additionnée d'acide acétique de façon à obtenir p. H = 6 meurt en une heure vingt-six minutes. Dans des conditions semblables une deuxième épinoche se trouvant dans la même solution de strychnine mais ayant un p. H = 7,7 meurt en quarante-trois minutes. Une troisième immergée dans la solution dont le p. H avait été porté à 9,5 par addition de carbonate de soude est morte en seize minutes.

Trois témoins placés dans des milieux ayant la même réaction effective que dans ces trois expériences étaient vivants à la vingt-quatrième heure.

Des différences analogues se sont reproduites avec d'autres alcaloïdes. Nous avons pu ainsi conclure que l'alcalinité du milieu favorise l'absorption des poisons par les poissons, comme nous avons pu le prévoir *à priori*.

Les poissons que nous avons employés supportent l'acidité ou l'alcalinité des solutions, tant qu'on ne sort pas d'une zone comprise entre p. H = 4,5 et p. H = 9,5.

Cependant pour nous placer dans des conditions telles que les solutions ne soient certainement pas toxiques par le seul fait de leur alcalinité excessive, nous avons jugé utile de ne pas dépasser une alcalinité correspondant à p. H = 9.

2° Tension superficielle

Dans le premier chapitre nous avons indiqué la raison qui, *à priori*, faisait prévoir l'intérêt qui

s'attache à l'abaissement de la tension superficielle.

Ce but peut être atteint par l'addition, aux solutions à étudier, de plusieurs substances comme l'alcool, l'éther, la saponine, le savon, la peptone, les sels biliaires. Les deux premières sont toxiques aux doses nécessaires pour obtenir un abaissement suffisant de la tension superficielle. La saponine même à des doses où cet abaissement est presque nul a montré une toxicité relativement considérable pour les poissons. Ainsi des vairons meurent en 20 minutes dans des solutions de saponine à 1 pour 4.000. Le savon est moins toxique, mais n'est pas utilisable car il donne dans l'eau ordinaire un précipité de savon de chaux dont il est difficile de se débarrasser, et qui rend impossible la mesure colorimétrique de la réaction du liquide.

La peptone et les sels biliaires n'ont aucun de ces inconvénients, mais comme pour obtenir la même tension superficielle il faut ajouter cinquante fois plus de peptone que de sels biliaires, nous avons préféré ces derniers.

Pour mesurer la tension superficielle avec une précision suffisante pour nos recherches, la technique la plus simple et la plus rapide réside dans l'emploi du compte-gouttes de Duclaux (1). Toutes nos mesures seront exprimées par le nombre de gouttes correspondant à 5 centimètres cubes de solution portée préalablement à 20 degrés. Dans la pratique il sera inutile d'effectuer cette mesure, ainsi que celle de la réaction, dans la solution alcaloïdique à étudier. Il suffira de les établir sur un liquide témoin contenant tous les éléments sauf l'alcaloïde. En effet, nous avons constaté que, aux dilutions auxquelles

1. Ce compte-gouttes est construit de façon que 100 gouttes correspondent à 5 centimètres cubes d'eau distillée, à 15 degrés.

on est amené à opérer, l'addition de celui-ci ne produira qu'une différence bien inférieure aux erreurs d'expérience.

Voyons maintenant, en ce qui concerne les sels biliaires, quelle est la dose maxima relativement peu toxique, qui conviendra pour nos expériences.

Cette dose varie suivant les sels biliaires envisagés. Nous avons employé tout d'abord une solution de bile cristallisée de Platner, dont un certain nombre de gouttes fut ajouté aux liquides à étudier. Ensuite nous avons opéré avec des sels biliaires Poulenc contenant 20 pour 100 de taurocholate de soude.

En réalisant des expériences comparatives pour étudier la toxicité de ces deux produits, nous avons constaté des différences importantes. Voici les moyennes de survie de douze épinoches résumées dans le tableau suivant:

Tens. superf.	Sels biliaires de Platner	Sels biliaires Poulenc.
136 gouttes	14 heures	39 heures
142 —	5 —	24 —
150 —	1 heure 30 min.	14 —

Il est possible que ces différences puissent s'expliquer par la proportion plus forte de taurocholate de soude dans la bile cristallisée de Platner que nous avons employée (1). Quoiqu'il en soit, en présence des résultats obtenus, nous avons préféré les sels biliaires Poulenc, et il ne sera question que de ceux-ci dans tout ce qui va suivre.

La conclusion qui s'est dégagée de nombreuses

1. Si cette hypothèse était vraie, une amélioration sensible de la technique serait réalisée par l'emploi du glycocholate de soude. Il nous a été impossible de nous le procurer au moment de nos recherches, mais nous pensons élucider ce point plus tard.

expériences entreprises a été qu'on ne peut pas sans inconvénient dépasser une tension superficielle de 136 gouttes, mesurée à 20°. Au-dessus, les sels biliaires commencent à intervenir par leur toxicité propre. D'ailleurs cette toxicité est diminuée lorsqu'on ajoute à la solution, de faibles quantités de carbonate de soude, fait que nous n'avons pas pu expliquer. Ce phénomène qui se produit autour du p. H = 8,6 est heureux, car sans changer sensiblement la tension superficielle il prolonge la vie des témoins.

Nous allons maintenant par quelques exemples montrer l'action de l'abaissement de la tension superficielle sur l'absorption des alcaloïdes.

Avec des vairons ou des épinoches placés toujours dans des conditions comparables, nous avons trouvé des différences de survie de l'ordre de celles-ci :

Taux des solutions	Sans sels biliaires		Avec sels biliaires	
			T. S. = 136 g.	
Cocaïne.....	1 p. 50.000	2 jours 11 h.	13 heures	
—	1 p. 100.000	3 jours 5 h.	26 heures	
Digitaline...	1 p. 200.000	20 heures	3 heures	
Picrotoxine..	1 p. 100.000	3 h. 8 min.	1 h. 52 min.	
Strychnine..	1 p. 100.000	57 min.	14 min.	
—	1 p. 200.000	1 h. 54 min.	50 min.	
—	1 p. 500.000	10 h.	5 h.	

L'étude critique de ces résultats prouve déjà que les sels biliaires, à la dose employée, n'interviennent point comme des corps dont la toxicité s'ajoute à celle des alcaloïdes, mais comme des facteurs agissant physiquement sur la tension superficielle. En effet on constate que, d'une façon régulière, ils accélèrent le moment de la mort dans des proportions qui varient peu suivant les alcaloïdes, et qui

dépendent visiblement du degré de dilution de ceux-ci.

D'ailleurs l'augmentation de la sensibilité est fonction de la quantité de sels biliaires ajoutée (1). Quatre vairons, placés dans des solutions de sulfate de strychnine à 1 p. 200.000 ayant des tensions superficielles égales à 100, 121, 132 et 136 meurent en 2 heures 13 minutes, 75, 50 et 40 minutes.

De plus, pour un même abaissement de la tension superficielle, que celui-ci soit obtenu avec des sels biliaires ou avec d'autres corps de faible toxicité, la durée de survie est la même. Ainsi, dans des solutions de sulfate de strychnine à 1 p. 200.000 amenés à une T. S. = 119, 124, 130 et 136 par la peptone, les vairons sont morts en 81, 70, 53 et 36 minutes, résultats qui concordent parfaitement avec ceux obtenus avec les sels biliaires.

Ces faits établis, la question suivante s'est posée à nous : ne serait-il pas possible, sans augmenter la dose de sels biliaires, de faire descendre encore plus la tension superficielle de nos solutions ?

Nous savions que E. Doumer et Edmond Doumer (2) ont établi que l'addition de chlorure de sodium augmente dans des proportions remarquables l'abaissement dû à des quantités données de glycocholate de soude. Or, comme les épinoches jouissent justement de la propriété de pouvoir vivre dans des eaux saumâtres (contenant jusqu'à 20 p. 1.000 de Na Cl) nous avons cherché à mettre à profit ce phénomène.

Malheureusement le mélange sels biliaires-chlo-

1. Bien entendu quand celle-ci n'atteint pas la dose toxique.

2. *La tension superficielle des solutions aqueuses de glycocholate de soude*. Société de Chimie physique. Paris, Séance du 13 avril 1921.

rure de sodium s'est montré très toxique pour ces poissons. Ce fait, qui n'a pas trouvé son explication par l'étude de la tension superficielle, a donc rendu le chlorure de sodium inutilisable pour le but indiqué.

Nous avons constaté d'ailleurs que le chlorure de calcium, sel peu toxique pour les poissons, abaisse plus que le chlorure de sodium la tension superficielle des solutions de sels biliaires. Quoique nous ayons eu avec lui, des résultats plus encourageants qu'avec le chlorure de sodium nous n'avons pas cru devoir nous engager, pour le moment, dans cette voie qui conduira peut-être les chercheurs à des résultats intéressants. Et c'est surtout pour cela que nous avons tenu à signaler ici ces faits.

3° Influence de la température

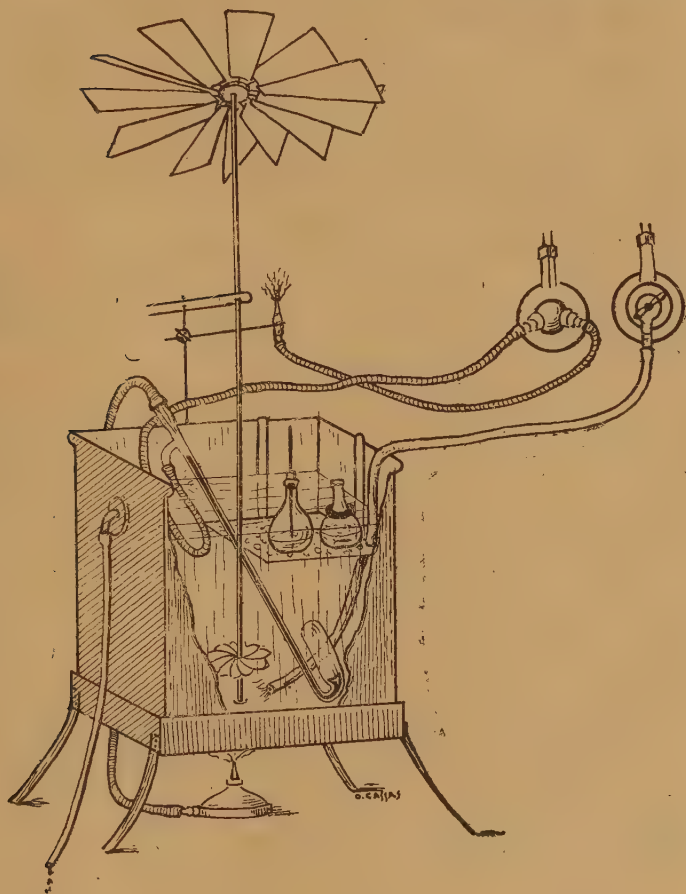
Dès le début de nos recherches nous avons été frappé par l'importance de ce facteur dans le déterminisme expérimental (1). Il est indispensable d'opérer à des températures connues et constantes. Des différences de deux degrés changent déjà très nettement les résultats obtenus. Il y a avantage d'autre part à maintenir les solutions à des températures supérieures à celle du laboratoire.

Nous avons employé un thermostat constitué par une cuve en zinc contenant une vingtaine de litres d'eau (voir le schéma). Un mince filet d'eau assure le brassage et un trop plein le niveau constant. Une plate-forme percée de trous est suspendue environ à deux centimètres au-dessous du niveau du liquide. Le tout est chauffé par un petit bec Bunsen commandé

1. Le professeur Charles Richet avait dès 1883 démontré l'influence de la température sur l'intoxication des poissons (C. Rend. de la Soc. de Biol., 1883, p. 587).

par un régulateur au xylol plongé dans l'eau de la cuve. Avec ce dispositif on obtient une température constante à un dixième de degré près.

Les poissons sont contenus dans des petits ballons



à fond plat qui reposent sur la plate-forme. Celle-ci est placée de façon à ce que les niveaux dans la cuve et à l'intérieur des ballons soient les mêmes.

Nous ferons remarquer ici, que toutes les expériences comparatives doivent être faites dans des

vases de même forme et avec la même quantité de liquide, car ainsi que l'a montré Mlle Eudoxie Bachrach (1), la forme des récipients et le rapport du volume du liquide à sa surface libre, ont une influence sur la survie des poissons en milieu toxique.

Pour notre part nous avons trouvé avantageux d'employer des petits ballons de 80 centimètres cubes, au lieu de cristallisoirs, car la perte due à l'évaporation est ainsi négligeable même au bout de quatre à cinq jours à 20 degrés ou au bout de quarante-huit heures à 25 degrés.

La température supérieure optima pour nos recherches est de 25 degrés. Les épinoches la supportent plus de quarante-huit heures, dans 25 centimètres cubes d'eau ordinaire.

En ce qui concerne les rapports qui existent entre la température et la résistance des poissons aux alcaloïdes, les résultats expérimentaux ont toujours été d'accord avec les vues théoriques. Dans de nombreuses expériences nous avons constaté d'une façon régulière que plus la température se rapproche de 25 degrés, plus l'intoxication des poissons est rapide.

Qu'il nous suffise de dire que des différences de 3 degrés peuvent, pour certains alcaloïdes, augmenter la sensibilité des poissons du simple au double. Ainsi, quatre vairons comparables placés dans des solutions de sulfate de strychnine (1 p. 100.000) à 18, 19, 20 et 21 degrés sont morts en 62, 57, 47 et 30 minutes respectivement. Lorsqu'on passe de 20 à 25 degrés la sensibilité devient en moyenne trois à quatre fois plus grande.

1. Comptes rendus de la Soc. de Biologie. Paris, 19 février 1921, p. 357.

Nous croyons inutile de rapporter ici ~~des~~ énumérations qui pourraient devenir fastidieuses. Dans le chapitre suivant nous donnerons d'ailleurs d'autres exemples, sur l'influence du facteur qui nous occupe, au cours de l'étude de quelques alcaloïdes.

CHAPITRE IV

Etude des sensibilités maxima obtenues avec quelques alcaloïdes et glucosides

Après avoir exposé les conditions expérimentales dans lesquelles nous nous sommes placé, et l'étude critique des différents facteurs qu'il y a intérêt à faire intervenir pour faciliter l'absorption des alcaloïdes par la branchie, nous allons passer en revue quelques-uns d'entre eux choisis parmi les plus importants au point de vue de la pratique toxicologique courante.

Nous nous attacherons surtout, d'une part à la recherche des sensibilités maxima qu'on peut atteindre avec la méthode que nous préconisons, d'autre part à la description des signes différentiels caractéristiques de chaque intoxication.

Bien entendu, pour ce qui est de ce dernier point on ne pourra pas, par la seule observation des symptômes présentés par les poissons, arriver à une détermination certaine d'un alcaloïde ou d'un glucoside donné. Comme toute méthode biologique, la nôtre, doit se contenter de déterminer tout au plus des alcaloïdes de groupe.

Les conditions expérimentales que nous avons choisies en définitive sont celles-ci : des petits poissons de poids semblables dans chaque série d'expériences seront placés dans 25 centimètres cubes de

solution alcaloïdique contenue dans des ballons de 80 centimètres cubes tous de la même forme. Dans chaque ballon on introduira quelques gouttes d'une solution de sels biliaires (à 12 p. 100 par exemple) en quantité suffisante pour avoir une tension superficielle égale à 136 gouttes pour 5 centimètres cubes, et quelques gouttes d'une solution de carbonate de soude (à 10 p. 100 environ) de façon à obtenir un $p. H = 9$.

Nous dirons que le milieu est *préparé* lorsqu'il contiendra des sels biliaires et du carbonate de soude dans ces proportions bien définies. Le tout sera maintenu à température constante.

C'est avec ce déterminisme expérimental qu'ont été réalisées les expériences dont nous allons rapporter maintenant un certain nombre, toutes faites avec des épinoches.

Mais nous devons avant tout indiquer quelle est la survie des témoins. Dans les conditions que nous venons de décrire et à 20 degrés ceux-ci vivent en moyenne de quarante à quarante-huit heures, et le plus souvent quarante-huit heures. Nous ne considérerons comme dues aux alcaloïdes introduits que les morts survenues avant la trentième heure, sauf dans deux cas où les poissons sont morts en trente-quatre et trente-cinq heures, mais parce que les témoins ont survécu onze et treize heures de plus.

Des expériences faites à 25 degrés nous ne citerons ici que celles où les poissons sont morts au plus à la vingtième heure, les témoins ayant survécu vingt-six heures au moins. C'est-à-dire que nous n'exposerons pas les résultats obtenus avec des poissons de moins de 1 gr. 20 et de plus de 1 gr. 80 (1). Ceci dans le seul

1. Nous avons vu dans le chapitre II que la durée de survie change suivant la taille des poissons.

but de rendre plus comparables dans une vue d'ensemble les résultats obtenus avec les différents alcaloïdes.

En opérant avec le déterminisme expérimental rigoureux que nous avons décrit, nous pouvons conclure de nos observations que, lorsque le laps de temps qui sépare la mort des poissons contenus dans les solutions alcaloïdiques et celle des témoins est égal pour le moins au quart de la survie de ceux-ci, on peut affirmer que la mort est due à l'intoxication par l'alcaloïde. Et en effet dans ces conditions, les poissons présentent avant la mort les signes caractéristiques de l'intoxication qui sont très nets pour certains poisons.

D'ailleurs il est certain que dans la pratique, pour un cas particulier, il importera peu que les témoins vivent plus ou moins longtemps (ce qui dépend de la taille) pourvu que l'écart entre leur survie et celle des poissons en observation ait une valeur de l'ordre de celle que nous avons indiquée. Donnons un exemple : dans des solutions à 1 pour 200 millions de chlorhydrate d'aconitine préparées, deux poissons de tailles différentes sont morts en dix et quinze heures et leurs témoins respectifs en quinze heures trente minutes et vingt-six heures. Les différences de survie entre chaque poisson et son témoin ont été de cinq heures trente dans le cas où le témoin a vécu quinze heures trente et de onze heures dans le cas où le témoin a vécu vingt-six heures. Les résultats de ces deux expériences sont concordants ; car les écarts de survie entre chaque poisson et son témoin sont à peu près proportionnels à la survie totale de ces derniers.

Ce fait a un intérêt démonstratif évident pour prouver que la mort des poissons est bien due à l'introduction de l'alcaloïde.

Nous n'avons d'ailleurs pas oublié de mettre à profit ces considérations pour l'établissement et la critique des sensibilités maxima qu'on peut atteindre.

I. — Sulfate de strychnine

1° *Sensibilité des réactifs chimiques.* — Parmi les réactifs généraux des alcaloïdes, le plus sensible vis-à-vis de la strychnine est l'acide silicotungstique qui permet de déceler une solution à 1 p. 200.000 soit 0 mgr. 0025 en employant un demi centimètre cube.

Son réactif spécial le plus sensible est le réactif de Mandelin (sulfovanadate d'ammoniaque) qui produit une coloration violette virant au rose par addition d'eau et qui est visible, paraît-il, dans une solution contenant un millième de milligramme.

2° *Sensibilité des réactions biologiques courantes.* — D'après Kobert, les doses mortelles par kilogramme d'animal sont 0 mgr. 6 pour le lapin, 0 mgr. 75 pour le chien et le chat, 1 milligramme pour le renard, et 2 milligrammes pour le hérisson et la grenouille.

Chez la grenouille — qui est parmi les animaux courants, un des plus impressionnables par la strychnine — la dose de 0 mgr. 033 injectée sous la peau produit toujours un empoisonnement, mais les doses de moins de 0 mgr. 025 intoxiquent certaines grenouilles et sur d'autres ne produisent aucun effet (1).

3° *Sensibilité des poissons avec notre méthode*

a) *Milieu non préparé.* — Avec une simple solution de sulfate de strychnine dans l'eau ordinaire on n'arrive guère à déceler qu'une solution à 1 p. 1.000.000 à 20 degrés;

1. Ch. Vibert, *Toxicologie*. Paris, 1907, p. 532.

b) *Milieu préparé.* — Avec le milieu préparé comme nous l'avons indiqué et à 20 degrés nous avons obtenu les résultats suivants :

Taux des solutions	Durée de survie
1 p. 500.000	25 minutes
1 p. 1.000.000	45 —
1 p. 2.000.000	1 heure 35 min.
1 p. 10.000.000	28 heures

Donc on peut déceler ainsi, dans 25 centimètres cubes de solution 0 mgr. 0025.

A 25 degrés :

Taux des solutions	Durée de survie
1 p. 5.000.000	1 heure
1 p. 10.000.000	1 heure 30 min.
1 p. 30.000.000	2 heures 45 min.
1 p. 40.000.000	9 heures 30 min.
1 p. 50.000.000	21 heures 30 min.

Dans des solutions à 1 p. 5 millions les poissons réagissent aux excitations à la cinquième minute, dans 1 p. 10 millions à la dixième minute, dans 1 p. 0 millions à la quinzième minute. Nous avons compté comme positive l'expérience faite dans la solution à 1 p. 50 millions car les poissons ont eu des réactions aux chocs à partir de la sixième heure et jusqu'à la mort.

On arrive donc à déceler ainsi 0 mgr. 0005 de strychnine (1/2000 de milligramme), c'est-à-dire deux fois moins qu'avec le réactif de Mandelin.

Avec la dose nécessaire pour obtenir des résultats certains avec une grenouille on pourrait établir une soixantaine d'expériences démonstratives avec les épinoches.

4° *Symptômes de l'intoxication chez les poissons.*

Comme pour tous les autres Vertébrés le symptôme capital est ici la convulsion tétanique généralisée ou provoquée. Lorsqu'on imprime un choc sur le ballon où est contenu un poisson intoxiqué par la strychnine, celui-ci réagit d'une façon typique par une secousse généralisée. Les poissons à épines sont des animaux de choix pour la recherche de la strychnine. Les épinoches par exemple réagissent aux excitations mécaniques par un brusque redressement de leurs quatre épines. Ce phénomène est d'une netteté absolue et suffit à lui seul pour caractériser la présence d'un poison tétanisant, la strychnine.

Mais les épinoches ont d'autres symptômes qui pourront compléter le diagnostic : accélération notable de la respiration dans une première période pendant laquelle le poisson vomit et rend de l'air. Pendant une deuxième période, où apparaissent les crises convulsives spontanées ou provoquées la respiration se ralentit progressivement jusqu'à son arrêt complet. Le poisson entre alors dans une phase de mort apparente : il ne respire plus, est sur le flanc et ne fait aucun mouvement. Il ne réagit plus aux excitations. Il n'est pourtant pas mort car si l'on examine ses nageoires sous le microscope avec un objectif à immersion dans l'eau on constate que la circulation n'est point arrêtée. Par ce moyen nous avons constaté que cette période de mort apparente peut se prolonger parfois une heure.

Nous avons pensé que cette phase de mort apparente peut être rapprochée de la période de paralysie complète chez la grenouille par exemple. Mais contrairement à ce que l'on observe chez cet animal,

nous n'avons pas retrouvé chez les poissons la troisième période caractérisée par le retour des accès convulsifs.

Nous devons dire que la durée de la période de mort apparente est très variable avec la strychnine. Il y a même des cas où nous ne l'avons pas observée ; la mort définitive arrive d'emblée. Or nous verrons que cette période se retrouve d'une façon constante dans l'intoxication par l'aconitine dont elle est même le symptôme capital.

Les autres signes différentiels de l'intoxication par la strychnine sont les suivants chez les épinoches : l'animal prend une couleur ocre jaune pâle pendant la vie, et il devient plus foncé (tacheté de noir) après la mort réelle ; sa moitié ventrale est argentée, l'iris ne change pas de couleur ; les épines sont redressées au maximum au moment de la mort et après ; la bouche est fermée complètement depuis le début de la période de mort apparente.

Nous ferons remarquer pour terminer, que lorsqu'on le pourra, il y aura intérêt à employer l'anguille, animal d'une extrême sensibilité pour la strychnine. Des anguilles de 20 grammes contenues dans des solutions à 1 pour 1 million dans l'eau ordinaire sans aucune préparation, réagissent d'une façon typique avant la dixième heure à 20°. Quoique nous n'avons pas pu réaliser l'expérience en employant la méthode de sensibilisation, nous avons la conviction qu'on arriverait avec ces animaux à déceler des solutions d'un taux inférieur à 1 pour 50 millions.

II. — Chlorhydrate d'aconitine

1^o *Sensibilité des réactions chimiques*

« Si la séparation de l'aconitine est relativement aisée, il est au contraire fort difficile de caractériser l'alcaloïde isolé ; car les réactions chimiques n'ont rien de précis : la démonstration d'un empoisonnement par une petite quantité d'aconitine ou par une préparation d'aconit est au nombre des problèmes les plus difficiles qui puissent être posés à un expert (1). »

L'acide phospho-antimonique, réactif général ainsi que l'acide phosphomolybdique, donnent des réactions visibles avec des solutions d'aconitine à 1 p. 1000 au moins. Ils permettent donc de déceler au plus 0 mg. 5.

Les réactifs spéciaux sont pour l'aconitine d'une valeur très discutée. C'est dire les difficultés que peut présenter la recherche toxicologique de cet alcaloïde dont un milligramme pris en une fois peut suffire pour amener la mort.

2^o *Sensibilité des réactifs biologiques courants*

Ogier (*loc. cit.*) a écrit : « L'expérimentation physiologique donne des résultats plus précis (que les réactions chimiques) mais qui cependant sont loin d'être toujours démonstratifs. »

D'après cet auteur un milligramme d'aconitine suffit pour tuer un chien. Pour tuer un lapin la dose mortelle est 0 mgr. 2 ; pour la grenouille 0 m. gr. 1.

1. J. Ogier, *Chimie toxicologique*, Paris, 1899.

D'après Duquesnel et Laborde (1) 0 mgr. 125 suffisent pour tuer un cobaye de 350 à 400 grammes, avec des symptômes caractéristiques. Mais ceux-ci apparaissent même avec 1/40 de milligramme.

Ces symptômes sont malheureusement moins nets avec la grenouille. Le cœur de la grenouille n'est pas non plus un réactif infallible de l'aconitine : « l'expérience est difficile et les résultats manquent de constance ».

3° Sensibilité des poissons avec notre méthode.

Or c'est précisément avec l'aconitine que nous atteignons par l'emploi de la méthode que nous avons étudiée, les plus hautes sensibilités. Nous ne pensons pas qu'il y ait beaucoup de substances toxiques auxquelles les poissons sont aussi sensibles.

Voici le résultat de 37 expériences :

a) Milieu non préparé :

Taux des solutions	Durée de survie	Température
1 p. 100.000	25 min.	20 degrés
1 p. 500.000	2 h. 20 min.	—
1 p. 500.000	1 h. 40 min.	23 degrés
1 p. 1.000.000	7 heures	20 degrés

b) Milieu préparé :

α) à 20 degrés.

1 p. 100.000	15 min.
1 p. 500.000	20 —
1 p. 1.000.000	25 —
1 p. 5.000.000	35 —
1 p. 10.000.000	40 —
1 p. 20.000.000	60 —
1 p. 50.000.000	1 h. 30 —

1. Des aconits et de l'aconitine. Paris, Masson, 1883.

1 p. 80.000.000 5 h. 30 min.

1 p. 100.000.000 10 heures

β) à 5 degrés.

1 p. 100.000.000 1 heure

1 p. 200.000.000 15 heures

Dans la solution à 1/300 millions les poissons sont morts en vingt-trois heures trente minutes avec les symptômes de l'intoxication ; mais l'écart avec les témoins a été de trois heures, donc nous ne tiendrons pas compte de ces résultats.

On peut donc par ce procédé déceler dans 25 centimètres cubes de solution, 0 mgr. 000125 ou 1/8000 de milligramme d'aconitine.

4° *Symptômes de l'intoxication chez les poissons.*

Ce qui est caractéristique de l'intoxication par l'aconitine c'est l'existence de deux périodes qui se succèdent d'une façon constante. Chacune d'elles est caractérisée par l'apparition de symptômes qui ne se retrouvent pas réunis pour aucun des alcaloïdes que nous avons examinés.

Pendant la première période les animaux se décolorent nettement mais pas d'une façon aussi intense que dans la cocaïne et sans que l'iris se décolore sensiblement comme dans celle-ci ; les épines sont toutes collées au corps ; la respiration qui au début est plutôt accélérée, se ralentit progressivement pendant tout le reste de la première période. A un moment donné une véritable dyspnée apparaît. Le poisson semble alors faire des efforts pour écarter ses opercules qui font des mouvements d'une grande amplitude.

Enfin la respiration s'arrête ; l'animal semble

mort, il est immobile, incliné sur le flanc. Il entre ainsi dans la période de mort apparente (1). Les épines sont alors collées au corps mais de temps à autre on observe leur brusque redressement. A partir d'un certain moment ce symptôme qui était le seul signe de vie donné par le poisson ne se produit plus.

Quel critérium aura-t-on alors pour savoir quel est le moment de la mort réelle? Ce sera l'examen microscopique de la circulation dans les capillaires des nageoires. On constatera ainsi que la circulation y est très active et qu'elle peut durer une heure et plus, même quand le poisson est laissé continuellement sur la platine du microscope. Ce phénomène qui se produit parfois avec la strychnine, est constant avec l'aconitine. Les symptômes de ces deux intoxications sont d'ailleurs si différents que leur diagnostic différentiel ne laissera jamais le moindre doute.

Pendant la période de mort apparente, le dos des poissons qui était décoloré devient foncé progressivement.

Au moment de la mort réelle les épines qui étaient collées se redressent, la bouche reste fermée (quand le poisson est resté dans l'eau), les ouïes s'écartent au maximum. Une dizaine de minutes après la mort on observe sur la peau l'apparition de plages qui se décolorent, contrastant avec d'autres qui restent colorées.

Nous croyons que l'ensemble de tous ces signes a

1. Les épinoches ne réagissent même pas quand on les comprime contre la paroi du vase avec une baguette de verre. Les vairons par contre réagissent en faisant un bond, puis retombent dans une immobilité absolue.

une réelle valeur pour la caractérisation de l'aconitine.

III. — Digitaline

1° *Sensibilité des réactifs chimiques*

Avec l'acide phospho-antimonique on obtient une réaction visible dans une solution de digitaline à 1 p. 1.000, c'est-à-dire qu'on peut déceler avec un demi-centimètre cube un demi-milligramme de ce glucoside.

2° *Sensibilité des réactifs biologiques courants*

D'après Vibert il faut au moins 2 milligrammes pour tuer un chat ou un chien de taille moyenne.

Chez la grenouille d'après B. Dupuy (1), si on place moins 1/4 de milligramme sous la peau il ne se produit rien. Cet animal constitue un bon réactif employé couramment. Chez la rana temporaria en effet le cœur se ralentit et s'arrête en systole, mais l'animal peut rester encore plusieurs heures vivant. Ceci prouve alors qu'il s'agit d'un poison cardiaque.

3° *Sensibilité des poissons avec notre méthode*

Voici les résultats de 18 expériences.

a) Milieu non préparé.

A 20° :

Taux des solutions	Durée de survie
1 p. 100.000	4 heures
1 p. 200.000	12 heures
1 p. 500.000	20 heures

b) Milieu préparé.

A 20° :

1. B. Dupuy, *Alcaloïdes*, 1889.

J. Lopez-Lomba

Taux des solutions	Durée de survie
1 p. 500.000	2 heures
1 p. 1.000.000	6 heures 45 min.
1 p. 2.000.000	13 heures
1 p. 4.000.000	22 heures 20 min.

A 25° :

1 p. 10.000.000	19 heures
-----------------	-----------

4° Symptômes de l'intoxication chez les poissons

La respiration est très accélérée. Le dos devient foncé contrastant avec le ventre très argenté. L'iris est plutôt décoloré. Les épines sont collées au corps pendant la vie, sauf dans les quelques minutes qui précèdent la mort où elles se redressent. Au moment de la mort elles retombent pour rester ensuite moyennement redressées. La bouche reste fermée. Le dos se décolore ensuite dans ses deux tiers postérieurs, le tiers antérieur restant seul coloré.

La mort réelle arrive d'emblée.

IV. — Sulfate neutre d'atropine

1° Sensibilité des réactifs chimiques

C'est l'acide silico-tungstique (1) qui est le réactif général le plus sensible. Il donne avec l'atropine un trouble qui est encore visible dans une solution à 1 pour 50.000.

La réaction spéciale la plus précise et sensible est celle de Vitali, mais elle se produit aussi avec l'hyosciamine, l'hyoscine, l'homatropine ; les ptomaines d'ailleurs peuvent la masquer facilement.

1. G. Bertrand, *Bull. de la Soc. clinique de Paris*, 1899 p. 434.

2° Sensibilité des réactifs biologiques courants

D'après Rhenter (1) la dilatation de la pupille des animaux à sang chaud peut être encore observée avec 0 mgr. 0005 d'atropine.

3° Sensibilité des poissons avec notre méthode.

a) *Milieu non préparé.* — A 20 degrés les épinoches meurent en plus de trois jours dans les solutions d'atropine à 1 p. 100.000. Cette dose n'est donc pas mortelle (certains témoins peuvent mourir dans le même temps) mais elle est toxique car les poissons ont certains symptômes de l'intoxication.

b) *Milieu préparé.* — Voici le résumé de 25 expériences.

A 20° :

Taux des solutions	Durée de survie
1 p. 100.000	26 heures
1 p. 200.000	39 heures

A 25° :

1 p. 200.000	20 heures
1 p. 500.000	23 heures
1 p. 800.000	16 heures

Ces résultats sont paradoxaux : les solutions à 1 p. 800.000 amènent une mort plus rapide que les solutions à 1 p. 500.000. Nous reviendrons sur ce point au chapitre suivant.

Quoiqu'il en soit les symptômes présentés par les poissons, caractéristiques de l'intoxication par l'atropine, apparaissent nettement dans les solutions à 1 p. 500.000 ; ils sont parfois douteux dans les solutions à 1 p. 800.000.

1. In Rossbach. *Klin. medic. Wochenschrift*, 1880.

L'intoxication étant donc certaine dans les solutions à 1 p. 500.000, nous concluons qu'on peut déceler par ce procédé 0 mgr. 05 d'atropine.

Nous ouvrons ici une parenthèse pour signaler un nouveau procédé qui permettra de déceler des quantités bien inférieures d'atropine. Voici son manuel opératoire : après avoir soigneusement essuyé une épinoche (ou mieux un vairon) avec un linge, de façon à enlever la mucine — et il y aurait même avantage à la plonger préalablement pendant quelques instants dans une solution diluée de carbonate de soude — fixons là sur un liège au moyen de deux épingles traversant l'une le menton, l'autre la nageoire caudale. Avec un agitateur à extrémité effilée, déposons alors une fine gouttelette d'une solution d'atropine à 1 pour 1.000 par exemple, sur la peau du poisson et étalons-la de façon à dessiner une bande transversale, une ligne ou une figure quelconque. Au bout de trois minutes environ nous commencerons à apercevoir une teinte foncée sur les endroits humectés avec la solution d'atropine. A la cinquième minute nous verrons nettement dessinée en noir la figure que nous avons tracée.

Rien n'est plus facile par ce procédé que de déceler par exemple un centième de milligramme d'atropine, même sans employer aucun artifice de sensibilisation.

A quoi est due cette coloration noire de la peau des poissons en présence d'atropine ? Elle est due à une dilatation remarquable des chromatophores (1), qu'il est facile d'observer avec une simple loupe.

D'autres substances telles que la cocaïne, et à un

1. Les chromatophores sont des cellules renfermant des granules de pigment et capables de changer de forme et de dimensions.

haut degré l'adrénaline, produisent un effet contraire : elles font contracter les chromatophores d'une façon notable. Avec une solution d'adrénaline à 1 pour 1.000 et probablement avec des solutions bien plus diluées encore on obtient sur la peau des poissons des belles taches blanches apparaissant en l'espace de quelques instants.

4° *Symptômes de l'intoxication chez les poissons*

Le symptôme capital est le noircissement de toute la région dorsale. Aucun autre alcaloïde de ceux que nous avons étudiés ne produit ce phénomène avec une intensité comparable à celle produite par l'atropine. L'iris devient aussi plus foncé. Les mâles ont parfois pendant la vie, sur le crâne, une petite tache blanche qui se détache nettement sur le fond noir. Les épines sont collées au corps jusqu'au moment de la mort. Peu après la mort les épines se redressent complètement, le dos se décolore dans ses deux tiers postérieurs. La bouche reste fermée.

Nous signalons que les vairons, par l'intensité de la coloration que prend leur dos, sont les poissons de choix pour déceler l'atropine.

V. — Chlorhydrate de cocaïne

1° *Sensibilité des réactifs chimiques et biologiques.*

L'acide silico-tungstique donne avec la cocaïne un trouble perceptible dans une solution à 1 p. 200.000.

D'après Ogier « aucune des réactions proposées pour caractériser la cocaïne n'est satisfaisante ».

Chez la grenouille il faut injecter plus de 5 milligrammes pour obtenir une phase d'excitation

motrice suivie de tétanos puis de l'inertie avec ralentissement cardiaque. Pour produire la mort il faut 50 milligrammes de cocaïne.

2° *Sensibilité des poissons avec notre méthode.*

Voici les moyennes de 30 expériences :

a) Milieu non préparé 20 degrés.

Taux des solutions	Durée de survie
1 p. 10.000	5 minutes
1 p. 20.000	13 minutes
1 p. 50.000	3 jours

b) Milieu préparé.

A 20 degrés.

Taux des solutions	Durée de survie
1 p. 50.000	20 minutes
1 p. 100.000	40 minutes
1 p. 150.000	40 heures

A 25 degrés.

1 p. 100.000	1 heure 30 min.
1 p. 200.000	20 heures
1 p. 300.000	21 heures
1 p. 500.000	22 heures
1 p. 1.000.000	12 à 21 heures

Il existe dans chacun de ces trois tableaux une zone dans laquelle à une faible variation du taux des solutions de cocaïne correspondent des différences de survie inattendues. Nous voyons ainsi dans le premier tableau que, tandis que le poisson qui est placé dans la solution à 1 p. 20.000 meurt en treize minutes, celui qui est dans la solution à 1 p. 50.000

ne s'en trouve pour ainsi dire pas incommodé car il vit presque autant qu'un témoin.

Avec les milieux préparés, cette zone se trouve autour de la dilution correspondant à 1 p. 125.000 à 20°. A 25° elle se trouve vers 1 p. 150.000.

Dans le troisième tableau on remarquera aussi que les poissons résistent moins bien dans les solutions à 1 pour 1 million que dans celles à 1 p. 500.000 (1) et que les différences de survie dans la première de ces solutions peuvent être considérables suivant les individus.

Nous ne considérerons comme dose mortelle que 1 p. 200.000 pour laisser un écart suffisant de survie entre les poissons en expériences et les témoins mais les solutions à 1 p. 500.000 sont certainement toxiques car les poissons présentent bien nettement les symptômes de l'intoxication par la cocaïne.

3° Symptômes de l'intoxication chez les poissons

Contrairement à l'atropine la cocaïne produit une décoloration notable du dos des poissons. La pigmentation disparaît presque totalement en quelques instants. Le dos devient jaune verdâtre très clair. Chez les femelles seules restent colorées — et plus qu'à l'état normal — deux tâches vertes au-dessus des yeux. Chez elles les iris se décolorent sensiblement. Chez les mâles les iris seuls deviennent plus colorés que chez les témoins et se détachent du reste du corps devenu très clair.

Le ventre est très argenté. La respiration est lente dès le début. De temps en temps le poisson redresse ses épines assez lentement.

1. Phénomène de même sens que celui qui s'est produit avec l'atropine.

Dans les solutions contenant plus de 1 p. 300. 000 le poisson se met en peu de temps sur le flanc, et, souvent, il a des mouvements de rotation autour de l'axe longitudinal du corps. On croit que le poisson va mourir, mais au bout de quelque temps, si la solution n'est pas trop concentrée, ces troubles disparaissent et l'animal survit encore parfois dix-huit heures après cette période.

Les épines sont collées et la bouche est fermée même une heure après la mort. Les opercules ne sont pas écartés.

VI. — Chlorhydrate de morphine

1° *Sensibilité des réactifs chimiques et biologiques.*

Le réactif de Frøehde donne d'après Ogier une réaction sensible avec 0 mgr. 005 de morphine.

D'après ce même auteur les réactifs biologiques ne semblent pas pouvoir être utilisés pratiquement dans les expertises.

Les animaux sont en effet peu sensibles à la morphine, surtout si celle-ci est injectée sous la peau. Cependant 1 milligramme de morphine introduit dans le cerveau d'un lapin suffit pour produire chez celui-ci du tremblement, de l'ataxie et un état de stupéfaction qui dure vingt-quatre heures environ.

Pour obtenir l'intoxication chez la grenouille il faut lui injecter 2 centigrammes de morphine. On observe alors une période de narcose suivie d'une période convulsive avec accès tétaniques.

2° *Sensibilité des poissons avec notre méthode*

Voici les résultats de 32 expériences :

a) *Milieu non préparé.* — Dans des solutions à

1 pour 10.000 à 25° les épinoches meurent en 20 heures. La solution à 1 pour 50.000 produit des différences de survie considérables (2 h. 40 et 20 h. 50), mais nous sommes là à la dose limite.

b) *Milieu préparé* :

A 20° :

Taux des solutions	Durée de survie
1 p. 50.000	13 heures
1 p. 100.000	36 heures
1 p. 200.000	21 heures 40 min.

A 25° :

1 p. 100.000	15 heures
1 p. 200.000	19 heures
1 p. 400.000	26 heures
1 p. 700.000	22 heures 30 min.
1 p. 1.000.000	20 heures

Les solutions à 1 pour 200.000 sont mortelles, mais il est bien difficile de parler ici de doses limites, car à partir d'un certain taux des solutions le parallélisme n'existe plus entre celui-ci et la durée de survie des animaux, comme cela s'est produit avec la cocaïne et l'atropine.

3° *Symptômes de l'intoxication chez les poissons*

La morphine est le seul poison végétal parmi ceux que nous avons étudiés, qui ne fait apparaître chez les épinoches un symptôme suffisamment saillant pour qu'il permette à lui seul de déterminer le groupe auquel appartient l'alcaloïde cherché.

Cependant les poissons présentent quelques symptômes qui, lorsqu'ils sont, réunis auront une réelle valeur.

Pendant la vie on observe une très légère décolo-

ration du dos qui apparaît quelques instants après l'immersion du poisson dans la solution. L'iris est aussi un peu décoloré ; mais le symptôme décoloration étant donné son peu d'intensité ici, ne prêterait pas à confusion avec la cocaïne. D'ailleurs, à partir d'un certain moment (quelque temps avant la mort), le dos devient foncé, signe que nous avons observé seulement avec la morphine. Le ventre n'est pas plus argenté que chez les témoins ; il jaunit plutôt. La bouche est fermée ou presque et reste ainsi longtemps après la mort. Les opercules sont entr'ouverts.

Les épines dorsales sont collées au corps pendant la vie. Après la mort elles sont redressées mais pas complètement ; elles font avec le dos un angle de 45° environ, tandis que dans la cocaïne les épines restent collées au corps.

CHAPITRE V

Aperçu sur l'application de la méthode aux recherches toxicologiques

1° *Du peu de sensibilité des poissons aux ptomaïnes.*

« Il est bien rare — a écrit Ogier — que dans des expertises exécutées sur les viscères toujours plus ou moins putréfiés on puisse arriver à éliminer en totalité les ptomaïnes ou alcaloïdes normalement produits par la putréfaction. »

Deux moyens s'offrent actuellement pour éviter cette cause d'erreur dans les expertises : le premier consiste à laisser quelques jours à l'air les extraits obtenus sur les verres de montre. Dans ces conditions les ptomaïnes se résinifient en partie, tandis que les résidus alcaloïdiques ne s'altèrent presque pas ; le second est l'injection de l'extrait au cobaye, animal qui est pour ainsi dire insensible aux ptomaïnes.

Or, d'une part, on ne peut jamais avoir une certitude sur le degré de transformation des ptomaïnes dans un cas donné ; d'autre part, le cobaye ne présente parfois aucun symptôme quand on lui injecte des doses relativement fortes de certains alcaloïdes.

Ainsi dans la pratique il se trouve des cas où le doute peut rester entier surtout si les réactions colorées n'ont pas toute la netteté voulue.

Nous n'avons pas fait une étude approfondie du degré de toxicité des ptomaïnes vis-à-vis des poissons,

mais nous avons tenu à faire dès à présent quelques expériences préliminaires.

Il est d'observation courante — et nous-même l'avons remarqué — que dans les mares où séjournent des cadavres d'animaux en putréfaction avancée, les petits poissons peuvent vivre et ne semblent pas en être incommodés. Or, il est bien probable que les ptomaïnes passent en solution dans l'eau de ces mares qui est toujours alcaline.

Comme on pouvait le prévoir *à priori*, deux expériences faites avec des extraits de foie humain en putréfaction moyenne (1) (provenant d'un homme mort par intoxication oxycarbonée) nous ont montré que, en opérant à 25 degrés et en milieu préparé, donc dans les conditions optimum d'absorption, la limite de toxicité était atteinte avec une solution à 1 pour 50.000 environ.

Deux autres expériences réalisées dans les mêmes conditions mais avec de la névrine, ont donné des résultats analogues ; la névrine ne se montre toxique pour les épinoches que dans des solutions plus concentrées que 1 pour 50.000.

2° Possibilité de dosage de certains alcaloïdes et glucosides par notre méthode

Choupe et Pinet ont montré (2) chez des chiens intoxiqués par du sulfate de strychnine, que si les doses toxiques peuvent varier dans des proportions sensibles d'un individu à l'autre, et chez un même

1. Nous remercions M. Kohn-Albert, chef du Laboratoire de toxicologie à la préfecture de Police, qui nous a aimablement procuré ces extraits.

2. Choupe et Pinet, Soc. de Biologie, 1887.

individu à des différents moments, la dose mortelle varie dans des limites très étroites.

Chez les poissons ces faits se reproduisent avec la strychnine, l'aconitine, la digitaline. La mort de l'animal fournit une indication assez précise sur la dose qui a été employée.

Mais avec certaines alcaloïdes nous avons constaté un fait dont nous ne connaissons pas l'explication : il n'y a pas un parallélisme constant entre la dose employée et la durée de survie. Des très petites doses déterminent une mort plus rapide que des doses plus fortes. Tout se passe comme si les doses relativement fortes déclenchaient un processus de défense qui prolonge la survie ; des doses plus faibles ne réveilleraient pas ce mécanisme protecteur et l'absorption de l'alcaloïde se trouverait facilitée.

Nous appelons l'attention sur ce phénomène qui se produit avec le sulfate d'atropine, et les chlorhydrates de cocaïne et de morphine, car il sera utile de l'avoir présent à l'esprit lorsqu'on voudra effectuer un dosage approximatif au moyen des poissons.

Par contre les expériences effectuées avec le sulfate de strychnine, le chlorhydrate d'aconitine et la digitaline nous ont montré qu'il y a un parallélisme constant entre la dose mortelle et la durée de survie. On pourra donc, en ce qui concerne ces substances toxiques, savoir d'une façon assez précise la quantité contenue dans la solution employée.

CONCLUSIONS

1° Les poissons de petite taille constituent un précieux réactif biologique susceptible de rendre de grands services dans la recherche de très faibles quantités d'alcaloïdes et glucosides.

2° Pour utiliser ces animaux de la manière la plus avantageuse il est nécessaire de modifier les conditions du milieu extérieur de manière à favoriser au maximum l'absorption par la branchie.

Le résultat est obtenu en agissant à la fois sur la tension superficielle du milieu, sur sa réaction, sur sa température.

3° Une étude méthodique de ces facteurs nous a montré que les conditions les plus favorables à l'absorption des substances toxiques sont réalisées lorsque la tension superficielle est telle qu'elle correspond à 136 gouttes pour 5 centimètres cubes, lorsque la réaction actuelle du milieu est égale à $p. H = 9$ et lorsque la température est de 25 degrés.

4° Ces conditions étant réalisées, si l'on immerge des poissons de petite taille dans 25 centimètres cubes de solution, on parvient à déceler de très faibles quantités d'alcaloïdes.

5° Les doses toxiques et les doses mortelles sont très variables suivant les alcaloïdes considérés. Les doses mortelles sont par exemple : $1/8000$ de milligramme pour l'aconitine, $1/2000$ de milligramme

pour la strychnine, $\frac{1}{8}$ de milligramme de cocaïne,
 $\frac{1}{400}$ de milligramme de digitaline.

6° Les poissons intoxiqués par les divers alcaloïdes
et glucosides présentent des symptômes qui peuvent
caractériser en une certaine mesure les différents
poissons.

7° D'après les quelques expériences que nous
avons pu faire, les poissons semblent beaucoup
moins sensibles aux ptomaïnes qu'aux alcaloïdes.

Vu : le président de la thèse,

ROGER

Vu : le doyen,

ROGER

Vu et permis d'imprimer,
Le recteur de l'Académie de Paris,

P. APPELL

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT-PROPOS.....	9
CHAPITRE I. — Considérations générales sur les recherches entreprises.....	11
CHAPITRE II. — Remarques concernant certaines conditions expérimentales.....	20
CHAPITRE III. — Conditions de sensibilisation maxima aux poissons. Etude méthodique de chaque facteur....	24
Réaction du milieu.....	24
Tension superficielle.....	31
Température.....	36
CHAPITRE IV. — Etude des sensibilités maxima obtenues avec quelques alcaloïdes et glucosides.....	40
Strychnine	43
Aconitine	47
Digitaline.....	51
Atropine.....	52
Cocaïne.....	55
Morphine	58
CHAPITRE V. — Aperçu sur l'application de la méthode aux recherches toxicologiques.....	61
CONCLUSIONS.....	64

